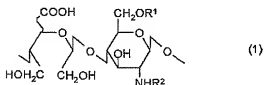


## GROWTH FACTOR ACTIVITY ENHANCER

## Abstract:

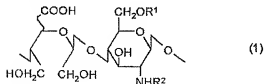
PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a medicine having low anticoagulant activity and excellent in growth factor activity enhancing effect.

SOLUTION: This growth factor activity enhancer is obtained by using a glycosaminoglycan derivative represented by the formula (1) having a recurring structure of a disaccharide of hexosamine with hexuronic acid as the basic skeleton, wherein the 2-positioned C and the 3-positioned C of the composing monosaccharide i.e., the hexuronic acid are cleaved and a part of or the whole of the 'uncleaved 2-positioned C are not substituted with sulfate group. (wherein, R<sup>1</sup> is H or SO<sub>3</sub>H; and R<sup>2</sup> is COCH<sub>3</sub> or SO<sub>3</sub>H.).



## CLAIMS

1. A growth factor enhancement agent comprising a glycosaminoglycan derivative or salt thereof as an active ingredient, the glycosaminoglycan derivative has the weight average molecular weight of 4,000 - 20,000 Da and has at least one structural portion expressed with a general formula (1) per one molecule of a glycosaminoglycan having a basic skeleton composed of repeated structure of hexosamine and hexuronic acid.



(R<sup>1</sup> is H or SO<sub>3</sub>H and R<sup>2</sup> shows COCH<sub>3</sub> or SO<sub>3</sub>H.)

2. The growth factor enhancement agent according to claim 1, wherein a glycosaminoglycan derivative or its salt further has the characteristic of following (c).

(c) By disaccharide analysis which combined decomposition by a glycosaminoglycan degradation enzyme, and analysis by high performance

chromatography, mol % of 2-deoxy 2-sulfamino-4-O-(4-deoxy 2-O-sulfo-alpha-L-Threo-hex-4-eno pyranosyl uronic acid)-6-O-sulfo- D-glucose is 0 to 10%, mol % of 2-deoxy-2-sulfamino-4-O-(4-deoxy alpha-L-threo-hex-4-eno pyranosyl uronic acid)-6-O-sulfo- D-glucose is 95 to 70%, mol % of 2-deoxy 2-sulfamino-4-O-(4-deoxy alpha-L-threo-hex-4-eno pyranosyl uronic acid)-D-glucose is 5 to 20%.

3. Medicine which comprises as an active ingredient the growth factor activity enhancement agent according to claim 1 or 2.

4. A composition containing the enhancement agent according to claim 1 or 2 and a growth factor.

5. Medicine which comprises as an active ingredient the composition of claim 4.

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-265369

(P2002-265369A)

(43) 公開日 平成14年9月18日 (2002.9.18)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-コード <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 K 31/726		A 6 1 K 31/726	4 C 0 8 4
31/727		31/727	4 C 0 8 6
45/00		45/00	4 C 0 9 0
A 6 1 P 25/00		A 6 1 P 25/00	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-62756(P2001-62756)

(71) 出願人 000195524

(22) 出願日 平成13年3月7日 (2001.3.7)

生化学工業株式会社  
 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(72) 発明者 臼杵 靖剛  
 神奈川県横浜市金沢区釜利谷東2-13-2-1007

(72) 発明者 瀬山 暁子  
 埼玉県浦和市西堀4-8-10-502

(72) 発明者 苅谷 豊  
 神奈川県横浜市港北区綱島西2-3-2-609

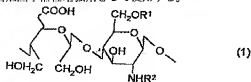
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増殖因子活性増強剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗血液凝固活性が低く、優れた増殖因子活性促進効果を有する薬剤の提供。

【解決手段】 ヘキソサミンとヘキシロン酸の二糖の繰り返し構造を基本骨格として有し、部分的にその構成単糖であるヘキシロン酸の2位と3位の炭素原子間が開裂しており、更に開裂していないヘキシロン酸の2位の水酸基の一部又は全部が硫酸基で置換されていないグリコサミノグリカン誘導体〔下記式(1)〕を有効成分として増殖因子活性増強剤として使用する。



(但し、R<sup>1</sup> はH又はSO<sub>3</sub>Hであり、R<sup>2</sup> はCOCH<sub>3</sub>又はSO<sub>3</sub>Hを示す。)

【整理番号】 J200003600

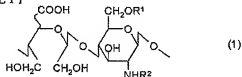
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) の特性を有し、且つ (b) に記載の一般式 (1) で表される構造部分を、ヘキソサミンとヘキスロン酸の繰り返し構造で形成される基本骨格を有するグリコサミノグリカンの 1 分子あたりに 1 個以上有することを特徴とするグリコサミノグリカン誘導体又はその塩を有効成分として含む増殖因子活性増強剤。

(a) 重量平均分子量が 4,000~20,000 Da (ダルトン) であること。

(b) 一般式 (1)

【化 1】



(但し、R<sup>1</sup>はH又はSO<sub>3</sub>Hであり、R<sup>2</sup>はCOCH<sub>3</sub>又はSO<sub>3</sub>Hを示す。)

【請求項 2】 グリコサミノグリカン誘導体又はその塩が更に下記 (c) の特性を有することと特徴とする、請求項 1 記載の増殖因子増強剤。

(c) グリコサミノグリカン分解酵素による分解と高速液体クロマトグラフィーによる分析を組み合わせた二糖分析により得られる二糖体組成において 2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ-α-L-Threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコースのモル%が 0~10%、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコースのモル%が 95~70%であり、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコースのモル%が 5~20%であること。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載の増殖因子活性増強剤を有効成分とする医薬。

【請求項 4】 請求項 1 又は 2 記載の増強剤と増殖因子とを含む組成物。

【請求項 5】 請求項 4 の組成物を有効成分とする医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、グリコサミノグリカンの誘導体を有効成分とする増殖因子活性増強剤及び該増強剤と増殖因子とを含む組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 ウロン酸残基とグリコサミン残基の繰り返し構造を基本骨格とする硫酸基を有するグリコサミノグリカンの一種であるヘパリンは、様々な増殖因子と親和性を有することが知られている (J. Biol. Chem., 26

8(32), 23898-23905 (1993) 等)。

【0003】 一方、ヘパリンは血中のアンチトロンビン III と結合し、血液凝固を阻害する活性が知られており、この活性はヘパリンを抗凝固剤として使用する場合以外はヘパリンを含む医薬品の重要な副作用の要因となる。従って、例えばヘパリンの有する増殖因子活性増強効果などを利用するために、上記副作用を低減させるための様々な試みがなされている (例えば特表平 6-50688 5、特表平 8-511764 等)。

【0004】 ヘパリンを改変し、抗凝固活性を低下させた種々のグリコサミノグリカン誘導体がこれまでに得られている。例えば特開平 11-310602 に記載された過ヨウ素酸酸化還元 2 脱硫酸化ヘパリン (PO2DSH) もそのような誘導体の一つであり、神経細胞に対して神経突起伸長活性を有していることが知られている。しかし、当該物質が増殖因子の活性を増強することは知られていなかった。

【0005】 一方、神経の損傷時に神経成長因子 (NGF) を投与すると、神経の再生を促進するが、NGF は痛覚過敏を引き起こすことが知られている (医学のあゆみ、195(9), 585-590 (2000))。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 神経損傷の治療において NGF の投与量を減らし、疼痛の惹起等の副作用を極力低減させることなど、増殖因子の活性を増強することで副作用を低減する手段の開発に対する要請が高まっていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記課題に鑑み、グリコサミノグリカン誘導体である PO2DSH が NGF の活性を増強することを見出し、更に当該グリコサミノグリカン誘導体が他の増殖因子、特に繊維芽細胞増殖因子 (FGF) に対しても同様にその活性を増強する作用を有することを見出し、本発明を完成した。

【0008】 すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

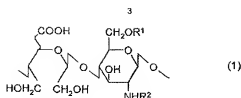
(1) 以下の (a) の特性を有し、且つ (b) に記載の一般式 (1) で表される構造部分を、ヘキソサミンとヘキスロン酸の繰り返し構造で形成される基本骨格を有するグリコサミノグリカンの 1 分子あたりに 1 個以上有することを特徴とするグリコサミノグリカン誘導体又はその塩を有効成分として含む増殖因子活性増強剤。

【0009】 (a) 重量平均分子量が 4,000~20,000 Da (ダルトン) であること。

【0010】 (b) 一般式 (1)

【0011】

【化 2】



【0012】(但し、R<sup>1</sup>はH又はSO<sub>3</sub>Hであり、R<sup>2</sup>はCOCH<sub>3</sub>又はSO<sub>3</sub>Hを示す。)

【0013】(2) グリコサミノグリカン誘導体又はその塩が更に下記(c)の特性を有することと特徴とする、(1)記載の増殖因子増強剤。

(c) グリコサミノグリカン分解酵素による分解と高速液体クロマトグラフィーによる分析を組み合わせた二糖分析により得られる二糖体組成において2-デオキシ-2-スルファミノ-4-0-(4-デオキシ-2-0-スルボ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-0-スルボ-D-グルコースのモル%が0~10%、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-0-(4-デオキシ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-0-スルボ-D-グルコースのモル%が95~70%であり、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-0-(4-デオキシ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコースのモル%が5~20%であること。

【0014】(3) (1)又は(2)記載の増殖因子活性化増強剤を有効成分とする医薬。

【0015】(4) (1)又は(2)記載の増強剤と増殖因子とを含む組成物。

【0016】(5) (4)記載の組成物を有効成分とする医薬。

【0017】

【発明の実施の形態】以下、発明の実施の形態により本発明を詳説する。本発明の増強剤は前記(a)の性質を有し、且つ(b)に記載の一般式(1)で表される構造を、ヘキシサミンとヘキシロン酸の繰り返し構造で形成される基本骨格1分子あたりに1以上有することを特徴とするグリコサミノグリカン誘導体又はその塩(以下「本発明誘導体」)を有効成分として含有する。

【0018】本発明誘導体は、上記一般式(1)の構造部分をヘキシサミンとヘキシロン酸の繰り返し構造で形成される基本骨格を有するグリコサミノグリカンの1分子あたりに1個以上有するオリゴ糖又は多糖である。ここで、「ヘキシサミン」とは、ヘキソース(六炭糖)の2位炭素原子にアミノ基、アセチルアミノ基又はスルボアミノ基を有し、6位ヒドロキシ基が硫酸化されていることもある単糖を指称し、「ヘキシロン酸」とは、ヘキソースの6位炭素原子がカルボキシル基を形成し、2位又は3位ヒドロキシ基が硫酸化されていることもある単糖を指称する。

【0019】尚、「グリコサミノグリカン」とは、上記ヘキシサミンとヘキシロン酸の繰り返し単位で形成される構造を基本骨格とするオリゴ糖又は多糖を指称する。本明細書において「硫酸基を有するグリコサミノグリカ

ン」とは、特に上記グリコサミノグリカンのうち、硫酸基を有するヘキシサミン又はヘキシロン酸を構成単糖として1以上有するグリコサミノグリカンを指称する。

【0020】本発明誘導体は重量平均分子重量5,500~25,000程度の、ヘパリン又はヘパリン硫酸などの硫酸基を有するグリコサミノグリカンを原料として用いて特開平11-310602に記載された方法に従って過ヨウ素酸化還元及びヘキシロン酸残基の2位硫酸基の脱硫酸化反応を行うことで調整することが可能である。

【0021】本発明誘導体の重量平均分子重量は試験法2に記載の分子重量測定法による測定値が4,000~20,000Daである。この重量平均分子重量は実施例の試験法2に記載の分子重量測定法による測定値から算出される値である。

【0022】また、本発明誘導体は上記(c)に記載した二糖体組成を特性として有していることが好ましい。ここで、本発明誘導体における上記(a)の二糖体組成は、後述する実施例の試験法1に記載の二糖分析法による測定値から算出したものである。

【0023】上記(c)に規定する二糖体組成は、試験法1に記載の二糖分析法により特定可能な下記一般式

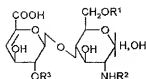
(2)で示される不飽和二糖の総量[2-アセトアミド-2-デオキシ-4-0-(4-デオキシ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコース(以下ΔDiHS-QSと記載する)、2-アセトアミド-2-デオキシ-4-0-(4-デオキシ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-0-スルボ-D-グルコース(以下ΔDiHS-GSと記載する)、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-0-(4-デオキシ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコース(以下ΔDiHS-NSと記載する)、2-アセトアミド-2-デオキシ-4-0-(4-デオキシ-2-0-スルボ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-D-グルコース(以下ΔDiHS-USと記載する)、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-0-(4-デオキシ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-0-スルボ-D-グルコース(以下ΔDiHS-di(6,NS)S)、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-0-(4-デオキシ-2-0-スルボ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-0-スルボ-D-グルコース(以下ΔDiHS-di(0,6)Sと記載する)、2-アセトアミド-2-スルファミノ-4-0-(4-デオキシ-2-0-スルボ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシルウロン酸)-6-0-スルボ-D-グルコース(以下ΔDiHS-tri(0,6,NS)Sと記載する)のモル%の合計]を100%として、上記(c)に記載した各不飽和二糖(ΔDiHS-tri(0,6,NS)、ΔDiHS-di(6,NS)S、及びΔDiHS-NS)の割合を示したものであり、当該数値は酵素消化前のグリコサミノグリカン誘導体の硫酸基の位置及び数を反映するものである。

【0024】

【化3】

5

6



(2)

【0025】

【表1】

不飽和二糖	構造式の置換基	R¹	R²	R³
ΔDHS-GS		H	COCH₃	H
ΔDHS-GS		SO₃H	COCH₃	H
ΔDHS-US		H	COCH₃	SO₃H
ΔDHS-US		SO₃H	COCH₃	SO₃H
ΔDHS-di(6,N)S		SO₃H	SO₃H	H
ΔDHS-di(U,N)S		H	SO₃H	SO₃H
ΔDHS-di(U,G)S		SO₃H	COCH₃	SO₃H
ΔDHS-tri(U,G,N)S		SO₃H	SO₃H	SO₃H

【0026】また、上記符号の示す構造は以下の通り表記されることもある。ΔDHS-GS: ΔHexA1→4GlcNAc, ΔDHS-GS: ΔHexA1→4GlcNAc(6S), ΔDHS-US: ΔHexA1→4GlcNAc, ΔDHS-US: ΔHexA(2S)1→4GlcNAc, ΔDHS-di(6,N)S: ΔHexA1→4GlcNAc(6S), ΔDHS-di(U,N)S: ΔHexA(2S)1→4GlcNAc, ΔDHS-di(U,G)S: ΔHexA(2S)1→4GlcNAc(6S), ΔDHS-tri(U,G,N)S: ΔHexA(2S)1→4GlcNAc(6S)。

【0027】上記式中、ΔHexAは不飽和ヘキシロン酸、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、GlcNSはN-硫酸化グルコサミン、カッコ内は硫酸基の結合位置を示す。

【0028】上記二糖分析法において生成する一般式(2)の構造を有する不飽和二糖は、分析対象となる本発明誘導体の基本骨格を構成する下記一般式(4)又は(5)のヘキシロン酸残基と一般式(7)のヘキソサミン残基が結合した一般式(3)中の(A)-(B)の構造より生ずる。また本発明誘導体は下記一般式(3)で表すこともできる。

【0029】

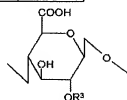
【化4】

OH-[ (A) - (B) ]<sub>n</sub>-H (3)

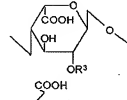
但し、(A)は下記一般式(4)で示されるグルコロン酸残基、下記一般式(5)で示されるイブロン酸残基、又は下記一般式(6)で示される開裂されたヘキシロン酸残基であり、

【0030】

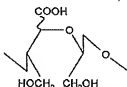
【化5】



(4)



(5)

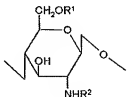


(6)

【0031】(B)は下記一般式(7)で示されるヘキソサミン残基をそれぞれ示す。

【0032】

【化6】



(7)

【0033】但し、一般式(4)~(7)においてR¹及びR²はそれぞれ独立にH又はSO₃Hであり、R²はそれぞれ独立にCOCH₃又はSO₃Hを示す。また一般式(7)のヘキソサミン残基においては、R¹及びR²の少なくとも一方がSO₃Hで示される。

【0034】また一般式(3)においてnは4≤n≤50を充たす整数であり、(A)の少なくとも一方は一般式(6)の残基である。

【0035】前記ヘキソサミンとしてはグルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミンなどが例示されるが、D-グルコサミンが好ましい。ヘキソサミンはアミノ基又は6位ヒドロキシル基のうち一方或いは両方が硫酸化さ

れている、すなわちD-硫酸化及び/又は6-O-硫酸化されていることが好ましいが、硫酸基を有しないヘキシロニン酸であってもよい。ヘキシロニン酸としてはD-グルクロン酸及びD-イブロン酸が挙げられる。ヘキシロニン酸の一部はその2位と3位の炭素原子間で開裂し、その開裂部位は還元されており、開裂していないヘキシロニン酸は、その2位のヒドロキシル基の一部又は全部が硫酸基で置換されていないことが好ましい。そして基本骨格中の繰返し単位の中に上記開裂されたヘキシロニン酸とヘキシロニン酸とが結合した前記一般式(1)で表される構造単位が本発明誘導体1分子あたり1以上存在する。

【0036】本発明増強剤はヒトを含む哺乳類の産薬として使用することが可能である。本発明増強剤に含まれる上述の本発明誘導体は、ヘパリン骨格を有する多糖が抱える副作用、すなわち抗血栓凝固活性が低減されたものである。本発明誘導体は、例えば最終濃度が3 $\mu$ g/mlで標準血漿に添加して後述の実施例中測定法3記載の方法に従ってAPTTを測定した際に、活性化トロンボプラスチン(APTT)が70秒未満、より好ましくは60秒未満、もっとも好ましくは50秒以下である。尚、上記標準血漿とは健康ラット10匹の皮下動脈より3.2%クエン酸/10容量血漿を採取し、その血液を1,000 $\times$ gで10分間遠心分離して得られた血漿を同量ずつ混合したものと定義される。

【0037】本発明誘導体は増殖因子の活性を増強する作用を有する。従って、本発明増強剤によって活性が増強される増殖因子は本発明誘導体の共存下、好ましくはは生理的条件下においてその活性が増強される増殖因子であればよいであってもよい。そのような増殖因子としては例えばヒト男性ホルモン誘導性増殖因子(AIGF)、トランスフォーミング成長因子(TGF)、インスリン様成長因子(IGF)、上皮細胞成長因子(EGF)、毛様体幹細胞増殖因子(CMTF)、FGF(酸性繊維芽細胞増殖因子(aFGF)、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF))、血小板由来増殖因子(PDGF)、脳由来成長因子(BDNF)、NGF、肝細胞増殖因子(HGF)、肝実質細胞増殖因子、血管内皮細胞成長因子(VEGF)、血管内皮細胞増殖因子(ECGF)、幹細胞増殖因子(CSF)、ミッドカイン(MK)、インターフェロニン(IFN- $\gamma$ )、角質細胞成長因子(KGF)、CXCL6、ミカイン、インターロイキン8(IL-8)、ピロチン(NV)、ヘパリン結合性脳細胞分裂誘導因子(BBIM)、及びヘパリン結合性神経突起伸長促進因子(BDNF)等が例示されるが、その中でも特にbFGF及びbNGFが好ましい。

【0038】

【実施例】以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。

#### 試験法1

【酵素による二糖分析】本発明誘導体及び標準ヘパリンの硫酸基の位置の分析は、次のようにして行った。すな

わち、これらの被検物質を酵素消化し、生成した不飽和二糖(前記一般式(2))を高速度液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した(生化学実験講座3、糖質II(東京化学同人刊、1991)p.49-62に記載の「2・8グリコサミノグリカン分解酵素とHPLCを組み合わせた構造解析」参照)。各不飽和二糖のピーク面積を計算し、全面積に対するピーク面積を百分率で表示した。

#### 【0039】(1) 酵素による消化

生化学実験講座3、糖質II p.49-62に記載の方法により消化酵素で分解した。標準ヘパリン及び本発明誘導体各1.0mgを2mM酢酸カルシウムを含む20mM酢酸ナトリウム(pH7.0)20 $\mu$ lに溶解して、20mlのヘパリナーゼ、20mlのヘパリダーゼI及びIIを加えて、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。

#### 【0040】(2) HPLCによる分析

標準ヘパリン又は本発明誘導体の碎屑による消化後の溶液50 $\mu$ lを、HPLC(理研化、モデル852型)を用いて分析した。イオン交換カラム(Dionex社、CarboPak PA-I  $\phi$ 4.0mm $\times$ 250mm)を使用し、232nmでの吸光度を測定した。不飽和二糖スタンダード(生化学工業株式会社製)を基準とし(Yamada, et al., J. Biol. Chem., 270, 8696-8706(1995))、流速1ml/分で、塩化リチウムを用いたグラジエント系(50ml $\rightarrow$ 2.5ml)を用いる方法に準拠した(XARIYA, et al., Comp. Biochem. Physiol. 103B, 473-479, (1992))。

#### 【0041】試験法2

【分子重量測定】標準ヘパリン又は本発明誘導体の1%溶液5 $\mu$ lをHPLCによるゲル透過で分析した。カラムはTSKgel(G4000+G3000+G2500)PW $\phi$ 、(東ソー、 $\phi$ 7.8mm $\times$ 30cm)を用い、0.2N塩化リチウムで、40 $^{\circ}$ C、0.6ml/分の流速で展開した。検出には示差折折計(島津製作所、AI-D-2A)を用いた。表1における重量平均分子量はヘパリンの分子重量標準品を対照として求めた(Xaneda et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 220, 108-112(1996))。

#### 【0042】試験法3

【APTT及びPTTの測定】APTTの測定のため、100匹のラットの皮下動脈より3.2%クエン酸/10容量で採取し、血液を1,000 $\times$ g、10分間遠心分離して得た血漿を混合した標準血漿100 $\mu$ lと様々な濃度の被検物質100 $\mu$ lとを測定用カップに入れ、37 $^{\circ}$ Cで1分間保温した。その後、予め37 $^{\circ}$ Cに保温しておいたアクトリン(商品名: ウェルファイド株式会社)100 $\mu$ lを添加し、更に2分間保温した。次いで、37 $^{\circ}$ Cに保温しておいた0.02M $\text{CaCl}_2$ 溶液100 $\mu$ lを添加し、この時より凝固が起こるまでの時間を血液凝固自動測定装置(KC-10A: アメリング社製)で測定した。また、APTTが100秒となる本発明誘導体の濃度を算出し、標準ヘパリンの前記濃度を本発明誘導体の前記濃度を基準として百分率で算出し、この数値(%)を本発明誘導体のAPTT活性とした。

【0043】TTの測定のため、上記標準血漿100 $\mu$ lと様々な濃度の被検物質100 $\mu$ lとを測定法カップに入れ、37℃で1分間保温した。その後、37℃に保温したトロロン(10U/ml)100 $\mu$ lを添加し、この時より凝固が起こるまでの時間を上記血液凝固自動測定装置で測定した。本発明誘導体及び標準ヘパリンのTTが100秒となる標準血漿中の最終濃度を求め、標準ヘパリンの前記濃度を本発明誘導体の前記濃度を基準として百分率で算出し、この数値(%)を本発明誘導体のTT活性とした。

【0044】【本明細書における標準ヘパリン】

以下に示す物性のヘパリンを標準ヘパリンとした。

(1) 上記試験法1に記載の二糖分析法による測定値から算出した標準ヘパリンの二糖体組成は表1に記載の通り、 $\Delta$ DiHS-OS: 4.1%、 $\Delta$ DiHS-NS: 3.4%、 $\Delta$ DiHS-6S: 3.7%、 $\Delta$ DiHS-US: 2.6%、 $\Delta$ DiHS-dl(6,N)S: 12.7%、 $\Delta$ DiHS-dl(U,N)S: 7.6%、 $\Delta$ DiHS-dl(6,N)S: 1.7%、 $\Delta$ DiHS-tri(U,6,N)S: 64.2%である。

(2) 抗血栓凝固活性が160IU/mgである。

(3) 重量平均分子量が11,000~14,000daである。

【0045】調製例

1: 標準ヘパリンの過ヨウ素酸酸化・還元によるヘキスロン酸の部分開裂処理標準ヘパリン(重量平均分子量: 13,700da, Syntex社製Lot. No.40210910: ヘパリンナトリウム塩) 1.3gを、過ヨウ素酸ナトリウムの存在下で酸化した。すなわちこの酸化反応は、50mlの0.05Mの過ヨウ素酸ナトリウム、50mlの酢酸ナトリウムを含んだpH5.0の溶液中で、標準ヘパリンを4℃、3日間酸化処理して行った。酸化処理後、過剰の過ヨウ素酸を最終濃度250m

Mのグリセリンを加えることで還元して分解し、蒸留水に対して2日間透析し、その後凍結乾燥することにより1.2gの過ヨウ素酸酸化ヘパリンを得た。この過ヨウ素酸酸化ヘパリンの生成時に生じたアルデヒド基を、30mlの0.2M水素化ホウ素ナトリウム、0.25M炭酸水素ナトリウムを含んだpH9.0の上記酸化ヘパリン1.2gを含む溶液を4℃、3時間反応させることでこの過ヨウ素酸酸化ヘパリンのアルデヒド基を還元した。過剰の水素化ホウ素ナトリウムは、氷酢酸で反応液のpHを5.0に調節し、30分間室温で放置することで分解し、再び5Mの水酸化ナトリウムでpH9.0に調節し、蒸留水に対して2日間透析し、その後凍結乾燥することにより、1.1gの過ヨウ素酸酸化還元ヘパリンのナトリウム塩を得た。

【0046】2: 過ヨウ素酸酸化還元ヘパリンの2-0-脱硫酸化

上記1で得た1.1gの過ヨウ素酸酸化還元ヘパリンのナトリウム塩を、20mlの0.05Mの水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、室温で20分間放置した。この溶液を凍結乾燥して選択的に2位の硫酸基を脱硫酸化した。このようにして得られた凍結乾燥パウダーを10mlの1M水酸化ナトリウム水溶液で溶解し、20%酢酸溶液でpH9.0に調節し、30分間室温に放置した。その後、蒸留水に対して2日間透析し、再び凍結乾燥して、脱硫酸化された過ヨウ素酸酸化還元ヘパリン(P02DSH: 本発明誘導体)のナトリウム塩0.8gを得た。上記試験法1に従い、酵素消化による二糖分析を行った結果を表1に示した。

【0047】

【表2】表1

	$\Delta$ DiHS-							
	OS	NS	6S	US	(6,N)S	(U,N)S	(U,6)S	(U,6,N)S
標準ヘパリン	4.1	3.4	3.7	2.6	12.7	7.6	1.7	64.2
P02DSH	0.0	11.9	0.0	0.0	84.2	0.0	0.0	3.9

【0048】また上記試験法2に従い、HPLCによりP02DSHの重量平均分子量を測定し、その結果を表2に示した。

【0049】

【表3】表2

	重量平均分子量(MW)
標準ヘパリン	13,700
P02DSH	11,100

【0050】実施例1

神経成長因子(NGF)活性の増強活性測定

被検物質としては調製例で得られたP02DSH及び標準ヘパリン(対照)を用いた。神経細胞PC12細胞(愛知心身障害者コロニー 大平敬一郎博士より恵与)2 $\times$ 10<sup>5</sup>個を10%胎児血清を含む2mlのダルベッコのDMEM培養液(以下単に「DMEM」と略記する)中で24時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター(0.5%(CO<sub>2</sub>/Air))を使用して培養した。

【0051】培養にはあらかじめ0.1mg/mlのポリジエン水溶液でコーティング処理した35mmコーニングディッシュを用いた。使用前にディッシュを水とDMEMで各々2

回ずつ洗浄した。洗浄後、ディッシュを無血清DMEM培地(1,10,50ng/mlでNGF、0.01,0.1,1.0,10,100 $\mu$ g/mlで被検物質を含む)に置換して更に72時間培養した。その後、1mlの2%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝生理的食塩水(以下「PBS」とも記載する)に置換して、室温で2時間ディッシュ上で細胞を固定した。固定後、1mlの1%カンシュープリアントブルー/50%メタノール・PBSに置換して、2時間ディッシュ上の細胞を染色した。染色後、2mlの5%メタノール/PBSに置換して、30分間脱色した。脱色液を廃棄した後に、ディッシュを緩やかな流水で更に脱色した。ディッシュを風乾し、神経突起伸長の様子を観察した。

【0052】NGF無添加、1ng/ml、10ng/ml、及び50ng/mlのNGFを添加して培養した際の神経突起伸長の程度と比較して、被検物質と1ng/mlのNGFを添加した際の神経突起伸長活性の活性化の程度を観察した(表3)。また、被検物質を添加しない群を陰性対照群とした。その結果、P02DSHを使用した場合は1ng/mlのNGF濃度であるにもかかわらず、50ng/mlのNGFを添加した際と同程度の神



経突起伸長が起っていることが判明し、このことから、PQ2DSIIはNGFの活性を大幅に増強する優れた活性を有していることが明らかとなった。

【0053】

【表4】表3

被検物質最終濃度( $\mu\text{g/ml}$ )	NGF(最終濃度 $1\text{ng/ml}$ )				
	0.01	0.1	1	10	100
標準ヘパリン	—	—	—	—	—
PQ2DSII	—	±	++	+	±

++：50ng/mlのNGFを添加した場合と同程度の活性

＋：10ng/mlのNGFを添加した場合と同程度の活性

±：陰性対照よりは活性を有するが、10ng/mlのNGFを添加した場合には及ばない程度の活性

－：陰性対照と同程度の活性

【0054】実施例2

塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)活性の増強活性測定  
実施例1と同じ被検物質を用いた。サブコンフルエントの線維芽細胞株A31細胞(BALB/c3T3; clone A31)を0.25%トリプシン/0.05%EDTA(エチレンジアミン四酢酸)水溶液で剥がし、10%牛胎児血清を含むRPMI1640(JWAKI社製)培地で速心洗浄した後、0.2%牛胎児血清を含むBasal ME/S-MEM(GIBCO社製)で $1 \times 10^5$ 個/mlに調整し、96穴マルチプレートに100  $\mu\text{l}$ /wellずつ播種した。Basal ME/S-MEM培地で1.2ng/ml、4ng/ml、12ng/ml、40ng/ml又は120ng/mlに調整したbFGFを50  $\mu\text{l}$ /wellずつ添加した。各濃度のbFGFを添加したwellにつき、Basal ME/S-MEM培地で調製した被検物質を4  $\mu\text{g/ml}$ 、40  $\mu\text{g/ml}$ 又は400  $\mu\text{g/ml}$

mlに調整したBasal ME/S-MEM培地を50  $\mu\text{l}$ /wellで添加した(最終濃度 bFGF: 0.3ng/ml、1ng/ml、3ng/ml、10ng/ml、30ng/ml 被検物質: 1  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$ )。この96穴マルチプレートを37℃で3日間、5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で培養した。培養後、CellCounting 溶液(DOJINDO社製)を20  $\mu\text{l}$ 添加して更に3時間培養後、450nmの吸光度を測定した。

【0055】その結果、被検物質を添加しなかった対照群(陰性対照群)はbFGFの濃度に依存して細胞増殖活性を示した。一方、被検物質としてPQ2DSIIを使用した群ではbFGFの活性を1.2～1.5倍程度促進することが観察された。この活性は標準ヘパリンを添加した陽性対照群と同等であった。

【0056】

【発明の効果】本発明により、抗血液凝固活性が低く、優れた増殖因子活性の増強剤が提供され、増殖因子による副作用の低減を図ることができる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F 1

ケマート(参考)

// C 0 8 B 37/08

C 0 8 B 37/08

Z

Dターム(参考) 4C084 AA17 DB52 MA02 NA14 ZA022  
ZC022

4C086 AA01 AA02 EA26 MA02 MA04  
NA14 ZA02 ZC02

4C090 AA02 BA62 BB22 BB24 BB33  
BB36 BB55 CA21 CA34 DA23